PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentkiassifikation 6:

H01F 1/11, B03C 1/01, C12Q 1/68, G01N 33/82, 33/68 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

26. März 1998 (26.03.98)

WO 98/12717

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/04828

A1

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. September 1997 (05.09.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 38 591.1

20. September 1996 (20.09.96) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANSELMANN, Ralf [DE/DE]; Sudetenstrasse 43, D-64839 Münster (DE). PELLATT, Martin, Geoffrey [GB/GB]; Crossmeat Gaunts Common, Wimborne, Dorset BH21 4JN (GB).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, TT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: SPHERICAL MAGNETIC PARTICLES

(54) Bezeichnung: KUGELFÖRMIGE MAGNETISCHE PARTIKEL

(57) Abstract

Monodisperse magnetic particles with a particle size from 50 to 1500 nm have a spherical silicium dioxide core punctually coated with magnetite particles with a particle size below 60 nm and a silicium dioxide covering layer. The particles are used for isolating nucleic acids and biotin, biotinylated nucleic acids and proteins or other biotin-marked molecules from aqueous solutions.

(57) Zusammenfassung

Monodisperse magnetische Partikeln einer Teilchengröße von 50 bis 1500 nm mit einem kugelförmigen Kern aus Siliciumdioxid, der punktuell mit Magnetitpartikeln einer Teilchengröße von weniger als 60 nm beschichtet ist und einer Deckschicht aus Siliciumdioxid. Die Partikeln werden für die Isolierung von Nucleinsäuren und Biotin, biotinylierten Nucleinsäuren sowie biotinylierter Proteine oder anderer mit Biotin markierter Moleküle aus wäßrigen Lösungen verwendet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanica	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litanen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegai
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgion	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	1E	irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belans	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Ralien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NI.	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	КP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ.	Kasachstan	RO	Rumânien		
CZ.	Tschechische Republik	ıc	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Licchtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EK	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/12717 - 1 -

Kugelförmige magnetische Partikel

Die Erfindung betrifft kugelförmige magnetische Partikel auf der Basis von monodispersen SiO₂-Partikeln, ihre Herstellung und ihre Verwendung.

5

Die Verwendung magnetischer Partikel für die Immobilisierung und Trennung von biologischen Materialien gewinnt zunehmend an Bedeutung. Im allgemeinen bestehen diese Partikel aus einem magnetischen Kern und einer Schutzschicht aus einem Metalloxid, auf der sich eine Polymerschicht befindet, die eine reversible Bindung des biologischen Materials an die magnetischen Partikel ermöglicht.

10

US 4 343 901 beschreibt magnetische Partikel für die Immobilisierung von Enzymen, die aus einem anorganischen Oxid und ferromagnetischen Partikeln bestehen, die durch eine Sol-Gel-Technik erhalten werden. Die Oberfläche der kalzinierten Partikel ist mit einem vernetzten Polyamin und Glutaraldehyd imprägniert.

20

15

US 4 152 210 beschreibt eine biochemisch aktive Substanz, die aus ferromagnetischen Partikeln und einen daran haftenden Enzym besteht. Die Partikel bestehen entweder aus mit Nickel beschichtetem Eisen oder aus gefälltem Eisenoxid. In beiden Fällen sind sie mit Aminopropyltriethoxysilan und Glutaraldehyd beschichtet. Die Partikel werden zur Abtrennung von biologisch aktivem Material aus Fermentationslösungen eingesetzt.

25

US 4 280 918 beschreibt eine Dispersion magnetischer Partikel, die durch Mischen einer Dispersion von je Fe₂O₃ oder Kobalt dotiertem Fe₃O₄ mit positiver Ladung mit kolloidalem SiO₂ mit negativer Ladung und nachfolgender Behandlung mit Ultraschall hergestellt wird.

30

35

EP 0 343 934 beschreibt magnetische Partikel, die aus einem Kern aus einem magnetischen Material und einer Hülle aus einem anorganischen Oxid bestehen. Die Herstellung erfolgt durch Emulgieren der Lösung eines Salzes oder eines wäßrigen Sols des magnetischen Materials und einer Lösung eines Salzes oder eines wäßrigen Sols des anorganischen Oxids

in einer mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeit, wobei diskrete Tropfen gebildet werden. Durch Einleiten von Ammoniak werden die Tropfen in eine Gel umgewandelt, anschließend von der flüssigen Phase getrennt, entwässert und kalziniert. Die erhaltenen Partikel haben überwiegend eine kugelförmige Gestalt.

Die aus dem Stand der Technik bekannten magnetischen Partikel haben den Nachteil, daß sie keine einheitliche Größe besitzen, Agglomerate nicht verhindert werden können und das Masseverhältnis zwischen magnetischem Kern und Hüllschicht Schwankungen unterworfen ist. Dadurch zeigen die Partikel kein einheitliches Verhalten im Magnetfeld, was sich negativ auf den Trennprozeß auswirkt.

Aufgabe der Erfindung ist es, monodisperse magnetische Partikel mit einer weitestgehend einheitlichen Größe und einem einstellbaren Verhältnis zwischen magnetischem Material und übrigen Bestandteilen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung gelöst durch monodisperse magnetische Partikel einer Teilchengröße von 50 bis 1500 nm, mit einem kugelförmigen Kern aus Siliciumdioxid, der punktuell mit Magnetikpartikeln einer Teilchengröße von maximal 60 nm beschichtet ist und eine Deckschicht aus Siliciumdioxid besitzt. In einer besonderen Ausführungsform sind die magnetischen Partikel in bekannter Weise silanisiert.

25

30

35

5

10

15

20

Weiterhin wird diese Aufgabe gemäß der Erfindung gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung der magnetischen Partikel, indem in einer ersten Stufe Kieselgel-Monospher in vollentsalztem Wasser bei 20 °C dispergiert und durch Zugabe einer Lösung aus Eisen(II)-sulfat und Eisen(III)-sulfat mit einer Dosiergeschwindigkeit von 0,05 bis 3 mg Fe₃O₄ pro Min. und pro m² Oberfläche der Monospher, wobei durch gleichzeitige Zugabe einer Base ein pH-Wert von 8 eingehalten wird, mit Fe₃O₄ punktuell beschichtet werden und in einer zweiten Stufe zu der Suspension der beschichteten Monospher eine wäßrige, essigsaure Tetraethylorthosilanlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,1 bis 5 mg SiO₂ pro Min. und pro m² Oberfläche

der unbeschichteten Monospher zudosiert wird, anschließend innerhalb von 30 Min. durch Zugabe einer Base die Suspension auf einen pH-Wert von 9 eingestellt und nachfolgend auf 75 °C erwärmt wird und danach die erhaltenen magnetischen Partikel (Monospher-Magnetbeads) abgetrennt, mit Wasser gewaschen und bei 60 bis 100 °C, gegebenenfalls im Vakuum, getrocknet werden.

Gegebenenfalls können die erhaltenen Monospher-Magnetbeads in einer dritten Stufe nach bekannten Verfahren silanisiert werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen magnetischen Partikel für die Isolierung von Nucleinsäuren und Biotin sowie biotinylierter Proteine aus wäßrigen Lösungen.

Die als Ausgangsmaterial zu verwendenden kugelförmigen monodispersen SiO₂-Partikel sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt.

Die grundliegenden Reaktionsbedingungen zur Herstellung von SiO₂-Partikeln durch hydrolytische Polykondensation sind beispielsweise aus den Publikationen von W. Stöber et al. in J. Colloid and Interface Science 26, 62(1968) und 30, 568(1969) sowie dem US-Patent 3,634,588 zu entnehmen. Die so hergestellten Partikel zeigen aber oft große Standardabweichungen für die Teilchendurchmesser und weisen eine gewisse Porosität auf.

25

30

35

20

5

10

Für die Herstellung von hochmonodispersen, unporösen, kugelförmigen SiO₂-Partikeln, die eine Standardabweichung von nicht mehr als 5 % aufweisen, wird auf EP 0 216 278 hingewiesen, die ein entsprechend abgestelltes Herstellungsverfahren auf Basis von hydrolytischer Polykondensation offenbart. Kern dieses Verfahrens, das für die Herstellung der SiO₂-Partikel gemäß vorliegender Erfindung bevorzugt wird, ist eine zweistufige Vorgehensweise. Hierbei wird zunächst durch hydrolytische Polykondensation von Tetraalkoxysilanen in wäßrig-alkalisch-ammoniakalischem Medium ein Sol bzw. eine Suspension von Primärteilchen gebildet, die man daran anschließend durch dosierte Zugabe von weiterem Tetraalkoxysilan auf die gewünschte Endgröße bringt.

Das Verfahren zur Herstellung von hoch monodispersen, unporösen kugelförmigen SiO₂-Partikel erfolgt in zwei Schritten.

In einem ersten Schritt wird zunächst ein Sol von Primärteilchen hergestellt. Hierzu wird das Tetraalkoxysilan in ein wäßrig-alkoholisch-ammoniakalisches Hydrolysegemisch gebracht und innig durchmischt. Als geeignete Tetraalkoxysilane können alle problemlos hydrolysierbaren Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole eingesetzt werden. In erster Linie kommen hierbei die Ester aliphatischer Alkohole mit 1-5 C-Atomen in Betracht wie etwa von Methanol, Ethanol, n- oder i-Propanol sowie der isomeren Butanole und Pentanole. Diese können einzeln, aber auch im Gemisch eingesetzt werden. Bevorzugt sind die Kieselsäureorthoester der C₁-C₃-Alkohole, insbesondere Tetraethoxysilan. Das Hydrolysegemisch sollte neben aliphatischen Alkoholen einen Gehalt von etwa 0.5 bis etwa 8 mol/l Ammoniak und von etwa 1 bis etwa 15 mol/l Wasser aufwei sen Als Alkoholkomponente sind geeignet, aliphatische C₁-C₂-Alkohole, bevorzugt C₁-C₃-Alkohole wie Methanol, Ethanol sowie n- oder i-Propanol. Diese können einzeln, aber auch im Gemisch miteinander im Hydrolysegemisch vorliegen. Die Zugabe des Tetraalkoxysilans zum Hydrolysegemisch erfolgt vorzugsweise in einer Portion, wobei der Reaktand in reiner Form oder auch in Lösung in einem der genannten Alkohole vorliegen kann. Zur Erzeugung der Primärteilchen kann eine Konzentration von Tetraalkoxysilan im Hydrolysegemisch zwischen etwa 0,01 bis etwa 1 mol/l gewählt werden. Nach dem Zusammenbringen der Reaktanden setzt die Reaktion sofort oder nach wenigen Minuten ein, was sich durch eine alsbaldige Opaleszenz bzw. Trübung des Reaktionsgemisches durch die entstehenden Teilchen zeigt. Nach im allgemeinen nicht mehr als 15-30 Minuten, in ungünstigen Spezialfällen auch länger, ist die Reaktion abgelaufen. Je nach Wahl der Reaktanden sowie ihrer Konzentrationen im Reaktionsgemisch lassen sich in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren Teilchen mit mittlerem Durchmesser zwischen etwa 0,01 und etwa 2 µm erhalten.

30

5

10

15

20

Bevorzugt wird in diesem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Reaktionsgemischen gearbeitet, die 3-13 mol/l Wasser, 0,5 bis 4,5 mol/l Ammoniak, 10 bis 25 mol/l Alkohol und 0,1-0,5 mol/l Tetraalkoxysilan enthalten. Man erhält hierbei Primärteilchen mit mittleren Durchmessern zwischen 0,01 und 1 µm. In diesem Stadium können dem Sol von Primärteilchen Proben entnommen werden, um die Teilchen beispielsweise mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auf ihre Teilchengröße, Formtreue und Teilchengrößenverteilung zu untersuchen.

Durch Isolation von Teilchenproben besteht die Möglichkeit, die Porosität der Primarteilchen beispielsweise durch Gasadsorptionsmessung zu bestimmen.

5

25

30

35

Als vorteilhaft hat sich erwiesen, die Reaktion zur Erzeugung der Primärteilchen bei höherer Temperatur durchzuführen. Günstig sind hierbei Temperaturen zwischen 35 und 75 °C, vorzugsweise zwischen 40 und 65 °C. Es zeigte sich, daß bei erhöhter Temperatur die Teilchengrößenstreuung abnimmt, allerdings auch die mittlere Teilchengröße. Bei niedrigeren Temperaturen, d.h. um Raumtemperatur, erhält man bei sonst gleichen Bedingungen größere Teilchen mit höherer Größenstreuung. Weiterhin ist hier auch vermehrt unerwünschte Agglomeratbildung zu verzeichnen.

Im zweiten Schritt des Verfahrens erfolgt bei gleichmäßiger Durchmischung ein langsames, kontinuierliches Zudosieren von weiterem Tetraalkoxysilan zu dem Sol von Primärteilchen. Hierbei ist es wesentlich, daß die Geschwindigkeit des Zudosierens so gesteuert wird, daß ein sofortiges, vollständiges Abreagieren mit den im Sol vorliegenden Teilchen erfolgt, ohne daß ein Überschuß Tetraalkoxysilan entsteht, aus dem sich Keime für neue Primärteilchen bilden können. Unter dieser Verfahrensmaßnahme des nach Maßgabe des Abreagierens kontrollierten Zudosierens von Tetraalkoxysilan wird ein gesteuertes Nachwachsen der Teilchen im Sol erreicht, wobei sich die letztendlich zu erzielende Teilchengröße nach der Menge des insgesamt zugesetzten Tetraalkoxysilans richtet. Die Menge des insgesamt zuzusetzenden Alkoxysilans ist im Prinzip unkritisch, solange das Hydrolysegemisch im Überschuß vorhanden ist, bzw.

durch eventuelles Nachgeben von Hydrolysegemisch im Überschuß gehalten wird. Ein zeitliches Limit bei der Zugabe des Tetraalkoxysilans ist nicht gesetzt; die Zugabe kann sich über Stunden bis Tage erstrecken. Auch Unterbrechungen und Wiederaufnahme des Nachwachsens sind möglich, da die Teilchen in allen Stadien ihres Wachstums stabil sind. Auch im Nachwachsvorgang wird bevorzugt bei erhöhter Temperatur, etwa um 40 °C, gearbeitet.

Nach diesem Verfahren können monodisperse kugelförmige Kieselsäure10 Partikel mit einer Partikelgröße von 50 bis 1500 nm hergestellt werden,
wobei eine gewünschte Größe sehr genau einstellbar ist, da die Standardabweichung vom mittleren Teilchendurchmesser nur 2 bis 5 % beträgt.

Die punktförmige Beschichtung der Kieselsäure-Monospher mit Magnetit erfolgt durch Ausfällen aus einer Lösung von Eisen(II)- und Eisen(III)- salzen, bevorzugt aus einer Lösung von Eisen(II)- und Eisen(III)- sulfat. Das Mol-Verhältnis zwischen dem zweiwertigen und dreiwertigen Eisensalz ist 1:1. Es ist zu beachten, daß die Fällungslösungen vor Oxidation geschützt werden müssen. Während der Fällung ist die Gegenwart von Oxidations- oder Reduktionsmitteln nicht erforderlich.

Der pH-Wert der Monospherdispersion wird für die Fällung des magnetischen Fe₃O₄ (Magnetit) auf Werte zwischen 7 bis 9, bevorzugt 7,5 bis 8,5 eingestellt. Der pH-Wert wird während der Fällungsreaktion durch Zugabe einer Base konstant gehalten, bevorzugt wird 25%ige wäßrige Ammoniaklösung verwendet. Die Temperatur der Suspension wird auf 0 bis 40 °C eingestellt.

Die Dosiergeschwindigkeit der Eisen(II)-Eisen(III)-salzlösung liegt zwischen 0,05 bis 3 mg Fe₃O₄ pro Min. und pro m² Oberfläche, bevorzugt zwischen 0,2 bis 1 mg Fe₃O₄ pro Min. und pro m² Oberfläche der Monospher.

30

5

15

20

Unter den angegebenen Bedingungen erfolgt eine punktförmige Abscheidung des Magnetits auf der Oberfläche der Monospher. Die Größe der Magnetitpartikel beträgt maximal 60 nm.

5 Die weitere Beschichtung der magnetischen Partikel mit SiO₂ erfolgt durch Hydrolyse von Tetraalkylorthosilanen, bevorzugt Tetraethylorthosilan. Hierfür wird die Suspension der mit Magnetit beschichteten Monospher auf eine Temperatur von 0 bis 40 °C, bevorzugt 10 bis 30 °C eingestellt und bei einem pH-Wert von 7 bis 9, bevorzugt 7,5 bis 8,5 eine wäßrige, essigsaure Lösung von Tetraethylorthosilan zudosiert. Die Konzentration des 10 Silans in der Lösung beträgt 10 bis 50, bevorzugt 20 bis 40 g SiO₂/l. Die Dosiergeschwindigkeit wird auf 0,1 bis 5 mg SiO₂ pro Min. und pro m² Oberfläche der unbeschichteten Monospher, bevorzugt 1 bis 2 g SiO₂ pro Min. und pro m² Oberfläche eingestellt. Nach dem Beenden des Zu-15 dosierens wird die Suspension auf 60 bis 90 °C, bevorzugt 70 bis 80 °C erwärmt und der pH-Wert innerhalb von 30 Min. auf 8 bis 10 mit 25%iger Ammoniaklösung angehoben und die Suspension 30 Min. bei dieser Temperatur und bei diesem pH-Wert gehalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die mit SiO₂ beschichteten magnetischen Partikel abge-20 trennt und mit vollentsalztem Wasser salzfrei gewaschen. Anschließend werden sie in vollentsalztem Wasser redispergiert.

Die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel bestehen aus einem SiO₂-Kern, beschichtet mit 5 bis 60, bevorzugt 20 bis 40 Gew.-% Magnetit, bezogen auf den SiO₂-Kern und einer SiO₂-Nachbeschichtung von 5 bis 30, bevorzugt 10 bis 20 Gew.-% SiO₂, bezogen auf den SiO₂-Kern.

In einer besonderen Ausführungsform kann die Oberfläche der magnetischen Partikel durch kovalent gebundene organische Gruppen modifiziert werden. Die hierfür verwendeten Silane sind so konstruiert, daß sie funktionelle Gruppen aufweisen, mit denen sich eine reversible Bindung des abzutrennenden Materials an die magnetischen Partikel erreichen läßt. Geeignete Silanisierungsmittel sind Verbindungen der Formel I

25

worin

R۱

Cl oder Alkoxy mit 1-6 C-Atomen

5

R2, R3

Alkyl mit 1-6 C-Atomen oder die Bedeutung von R1

l

die Zahlen 1-6

Х

eine Einfachbindung, O, NH, CONH, NHCONH

10

R4

15

mit

$$Y = CH \text{ oder } +$$

20

Z = OR oder zwei Reste Z gemeinsam $-O - \cdot$

und

m, n die Zahlen 0-6,

oder

25

wobei

30

Χ

eine Einfachbindung ist,

mit R, R', R" = H oder Alkyl mit 1-6 C-Atomen.

Die auf den magnetischen Partikeln befindliche Deckschicht aus SiO₂ besitzt freie oder hydratisierte Element-O- oder Element-OH-Gruppen an der Oberfläche, die einer chemischen Reaktion mit dem Silanisierungsmittel unter Ausbildung kovalenter Silicium-Sauerstoff-Siliciumverbindungen zugänglich sind. Die magnetischen Partikel werden in einer wäßrigen-alkoholischen Suspension, wobei das Verhältnis von Wasser zu Ethanol 2,5:1,5 beträgt, mit dem Silanisierungsmittel umgesetzt. Einzelheiten der Silanisierung können DE 42 33 396 und DE 43 16 814 entnommen werden, aus denen auch die obengenannten Silanisierungsmittel bekannt sind.

Die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel können für die Isolierung von Nucleinsäuren aus wäßrigen Lösungen und für die Isolierung und Aufreinigung von Biotin und biotinylierten Proteinen aus wässrigen Lösungen verwendet werden.

Da Nucleinsäuren direkt an Siliciumdioxid gebunden werden, ist eine Nachbeschichtung der magnetischen Partikel, beispielsweise mit Silanen, nicht erforderlich.

20

25

30

5

10

15

Für die Extraktion von DNA aus Agarose-Gel wird ein Stück des mit Ethidiumbromid behandelten Gels in ein geeignetes Gefäß überführt und ein
Silica bindender Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 zugegeben. Das Gel
wird resuspendiert und mit magnetischen Partikeln vermischt. Nach Erwärmen der Suspension auf 50 °C für 10 Min. werden mit Hilfe eines Magneten die Partikel an die Gefäßwand gezogen und die verbleibende Flüssigkeit entfernt. Nach einmaligem Redispergieren und Waschen der magnetischen Partikel mit der obengenannten Pufferlösung wird das Waschen
mit einem Ethanol enthaltenden Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 wiederholt. Anschließend werden die magnetischen Partikel getrocknet, in einem
Tris-HCI Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 resuspendiert und nach Erwärmen auf 50 °C für 5 Min. eluiert. Die magnetischen Partikel werden von
der Pufferlösung, die die DNA enthält, im Magnetfeld abgetrennt.

Die Pufferlösungen, die für die Abtrennung von DNA aus wäßrigen Lösungen mit Hilfe magnetischer Partikel benötigt werden, werden von der Merck KGaA angeboten. Sie enthalten als wesentlichste Bestandteile NaClO₄, Tris-HCl und EDTA. Dieses Trennverfahren ist von folgenden Autoren näher beschrieben worden: Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619; Yang, R.C.A.; Lis, J.; Wu, B. (1979). Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis; Methods Enzymol, 68, 176-182; Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E.; van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.

5

10

Für die Isolierung und Aufreinigung von Biotin und biotinylierten Proteinen 15 oder Nucleinsäuren aus wäßrigen Lösungen mit Hilfe von magnetischen Partikeln, an die Streptavidin gekoppelt ist, ist eine Modifizierung der Oberfläche der magnetischen Partikel mit organischen Gruppen notwendig. Hierfür sind die oben erwähnten Silane, beispielsweise y-Aminopropylsilan, geeignet. Die Kopplung von Streptavidin wird noch verbessert. 20 wenn nach der Silanisierung der SiO₂-Oberfläche noch eine Modifikation mit Azlacton erfolgt. Dieses Verfahren für die Gewinnung von Biotin und biotinylierten Proteinen oder Nucleinsäuren aus wäßrigen Lösungen wird von folgenden Autoren näher beschrieben: Hultman T. Stahl S. Hornes E. Uhlén M. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA 25 using magnetic beads as solid support. Nucleic Acids Research 1989: 17(13):4937-4946; Ahmed ARH, Olivier GWJ, Adams G, Erskine ME, Kinsman RG, Branch SK, Moss SH, Notarianni LJ, Pouton CW, Isolation and partial purification of a melanocyte-stimulating hormone receptor from B16 murine melanoma cells; A novel approach using a cleavable biotiny-30 lated photoactivated ligand and streptavidin-coated magnetic beads. Biochem J 1992;286:377-382; Wahlberg J, Hultman T, Uhlén M. Solid phase sequencing of PCR products in: McPherson MJ, ed. PCR II - A Practical Approach. Oxford: IRL Press, Oxford University Press, 1994; Danilo A. Tagle, Manju Swaroop, Michael Lovett and Francis S. Collins 35 (1993). Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments Nature 361m 751-753.

Mit Streptavidin gekoppelte magnetische Partikel werden von der Merck KGaA unter der Bezeichnung "Bio Beads Streptavidin" angeboten.

Die Bindekapazität der erfindungsgemäßen magnetischen Partikel liegt für DNA bei ca. 5 µg/mg Beads. Für die Streptavidin beschichteten Partikel ist die Bindekapazität sehr stark abhängig von der zu isolierenden Substanz.

Die erfindungsgemäßen kugelförmigen magnetischen Partikel haben den Vorteil, daß sie monodispers, unporös und in verschiedenen Größen herstellbar sind. Die Standardabweichung vom mittleren Durchmesser beträgt weniger als 5 %. Das Masseverhältnis zwischen dem magnetischen Material und den übrigen Bestandteilen ist in engen Grenzen einstellbar. Dadurch zeigen die Partikel ein gleiches Verhalten im Magnetfeld.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie zu begrenzen.

Beispiel 1

10

700 g Monospher (bez. auf SiO₂-Gehalt) mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 500 nm werden unter Rühren in 1500 g vollentsalztes Wasser eingeführt und das Gemisch eine Stunde mit einem Ultra-Torrax dispergiert. Anschließend wird mit 11800 g vollentsalztem Wasser die Dispersion auf einen SiO₂-Gehalt von 5 % eingestellt und auf 20 °C temperiert.

210 g Eisen(II)-sulfat-heptahydrat (Artikel-Nr. von Merck KGaA: 1.03965) und 380 g Eisen(III)-sulfathydrat 80 % (Artikel-Nr. von Merck KGaA: 3926) werden unter Rühren in 4500 g vollentsalztem Wasser gelöst und in ein verschließbares Vorratsgefäß gegeben.

Weiterhin wird eine 10%ige wäßrige Ammoniaklösung zur Konstanthaltung des pH-Wertes in ein geschlossenes Vorratsgefäß überführt.

Die Eisensulfatlösung wird nun innerhalb von 2 Stunden zu der auf 20 °C temperierten Monospherdispersion zudosiert, wobei durch gleichzeitige Zugabe der Ammoniaklösung der pH-Wert auf 7,7 eingestellt wird. Nach einer halben Stunde Nachreaktion wird mit der SiO₂-Beschichtung begonnen.

350 g Tetraethylorthosilan werden unter Rühren in einer geschlossenen Apparatur in einem Gemisch aus 290 g Eisessig und 2275 g vollentsalztem Wasser innerhalb von 30 Min. gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit einer Geschwindigkeit von 120 ml/Min. der Dispersion der mit Magnetit beschichteten Monospher zudosiert. Danach wird innerhalb von 30 Min. der pH-Wert mit der wäßrigen Ammoniaklösung auf 9,0 angehoben und die Dispersion auf 75 °C erwärmt und für 30 Min. auf diesem Wert gehalten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Dispersion aufgearbeitet.

Innerhalb von 8 Stunden wird die Dispersion fünfmal dekantierend mit 6 I vollentsalztem Wasser gewaschen, wobei die Sedimentationsgeschwindigkeit der magnetischen Partikel durch Anlegen eines Magnetfeldes beschleunigt wird. Die erhaltene Dispersion wird auf einen Massegehalt von 20 % eingestellt.

Beispiel 2

5

10

15

20

35

Zu 400 ml einer nach Beispiel 1 erhaltenen Suspension magnetischer Partikel werden 190 ml Ethanol zugesetzt, um ein Volumenverhältnis von Wasser zu Ethanol von 2,5:1,5 einzustellen. Dann wird ein Gemisch von 57,5 g γ-Aminopropyltriethoxysilan in 57,5 g Ethanol zugesetzt. Es wird noch 10 Stunden am Rückfluß gekocht, danach das Lösungsmittel entfernt, die Partikel mit Ethanol gewaschen und in Wasser redispergiert, wobei der Gehalt an Trockensubstanz auf 20 Gew.-% eingestellt wird. Die magnetischen Partikel besitzen an der Oberfläche gebundene endständige Amino-Gruppen. Die weitere Verwendung der magnetischen Partikel erfolgt in Form der wäßrigen Dispersion.

Patentansprüche

- Monodisperse magnetische Partikel einer Teilchengröße von 50 bis 1500 nm mit einem kugelförmigen Kern aus Siliciumdioxid, der punktuell mit Magnetitpartikeln einer Teilchengröße von weniger als 60 nm beschichtet ist und darauf eine Deckschicht aus Siliciumdioxid besitzt.
- Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer
 Verbindung der Formel I

$$[R^1R^2R^3]Si-(CH_2)_1-X-R^4$$
 (1)

worin

15

R1 Cl oder Alkoxy mit 1-6 C-Atomen

R2, R3 Alkyl mit 1-6 C-Atomen oder die Bedeutung von R1

20 l die Zahlen 1-6

X eine Einfachbindung, O, NH, CONH, NHCONH

30

mit $Y = CH \text{ oder } + \underbrace{X}$, $+ \underbrace{H}$

Z = OR oder zwei Reste Z gemeinsam -O

und m, n die Zahlen 0-6,

oder

5

15

20

wobei

Х

eine Einfachbindung ist,

mit R, R', R" = H oder Alkyl mit 1-6 C-Atomen modifiziert sind.

Verfahren zur Herstellung monodisperser magnetischer Partikel nach 3. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einer ersten Stufe Kieselgel-Monospher in vollentsalztem Wasser bei 20 °C dispergiert und durch Zugabe einer Lösung von Eisen(II)-sulfat und Eisen(III)sulfat mit einer Dosiergeschwindigkeit von 0,05 bis 3 mg Fe₃O₄ pro Min. und pro m² Oberfläche der Monospher, wobei durch Zugabe einer Base ein pH-Wert von 8 eingehalten wird, mit Fe₃O₄ punktuell beschichtet werden und in einer zweiten Stufe zu der Suspension der beschichteten Monospher eine wäßrige, essigsaure Tetraalkylorthosilanlösung mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 5 mg SiO₂ pro Min. und pro m² Oberfläche der unbeschichteten Monospher zudosiert wird, anschließend die Suspension auf 75 °C erwärmt und innerhalb von 30 Min. durch Zugabe einer Base auf einen pH-Wert von 9 eingestellt wird und danach die erhaltenen magnetischen Partikel abgetrennt, mit Wasser gewaschen und in vollentsalztem Wasser redispergiert werden.

30

25

4. Verfahren zur Herstellung monodisperser magnetischer Partikel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zu der Dispersion der magnetischen Partikel Ethanol in einer Menge zugegeben wird, bis ein Volumenverhältnis von Wasser zu Ethanol von 2:1,5 erreicht ist und anschließend in einer ethanolischen Lösung eine Verbindung der Formel I

$$[R^1R^2R^3]Si-(CH_2)_1-X-R^4$$
 (I)

10 worin

5

15

25

R1 Cl oder Alkoxy mit 1-6 C-Atomen

R2, R3 Alkyl mit 1-6 C-Atomen oder die Bedeutung von R1

l die Zahlen 1-6

X eine Einfachbindung, O, NH, CONH, NHCONH

20 R4 ON CH₂)_m-C-Z

mit Y = CH oder + H

Z = OR oder zwei Reste Z gemeinsam -O

30 und m, n die Zahlen 0-6,

oder

	:
wa	Dei:
***	$\mathbf{v}_{\mathbf{v}_{\mathbf{i}}}$

X eine Einfachbindung ist,

- mit R, R', R" = H oder Alkyl mit 1-6 C-Atomen, zugegeben wird und nach Kochen am Rückfluß für 5 bis 24 Stunden die modifizierten magnetischen Partikel abgetrennt, gewaschen und in vollentsalztem Wasser redispergiert werden.
- Verwendung der magnetischen Partikel nach den Ansprüchen 1 oder 2 für die Isolierung von Nucleinsäuren und Biotin sowie biotinylierter Proteine aus wäßrigen Lösungen.

15

20

25

30

Inte anal Application No PCT/EP 97/04828

4 01 100	CONTROL OF OUR IFOR ALL TIPES		
A. CLASS IPC 6	HO1F1/11 B03C1/01 C12Q1/6	8 G01N33/82	G01N33/68
According t	o Infernational Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC	
	SEARCHED		
Minimum de TPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classificati HO1F BO3C GO1N	on symbols)	
1100	uoti posc dotu		
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that s	such accuments are included in the	fields searched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data ba	ise and, where practical, search tel	rms used)
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rela	evant passages	Relevant to claim No.
Α	DE 43 07 262 A (C. BERGEMANN.) 8	September	1-5
••	1994]
	see the whole document		
		,	
A	GB 2 125 018 A (UOP INC.) 29 Feb	ruary 1984	1-5
	see the whole document		
Α	US 4 124 735 A (M. P. O'HORO.) 7	November	1-5
	1978	MO 4 CHIDCT	
	see the whole document		
	THE STATE OF THE S		
Α	DE 42 33 396 A (MERCK PATENT GMB)	₹.) 7	1-5
	April 1994 cited in the application		
·	see the whole document		
ļ			
	-	-/	
X Funt	ner documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members a	re listed in annex.
' Special ca	tegories of cited documents :	"T" later document published afte	
	int defining the general state of the art which is not ered to be of particular relevance	or priority date and not in col cited to understand the princ	nsict with the application but iple or theory underlying the
"E" earlier o	ocument but published on or after the international	invention "X" document of particular releval	nce; the claimed invention
filing d	ate nt which may throw doubts on priority claim(s) or	cannot be considered novel involve an inventive step who	or cannot be considered to en the document is taken alone
which	is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevan	
	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	document is combined with o	one or more other such docu-
	ent published prior to the international filling date but	in the art.	ing obvious to a person skilled
later th	an the priority date claimed	"&" document member of the sam	ne patent family
Date of the	actual completion of theinternational search	Date of mailing of the internat	ional search report
	2 January 1000	20/01/1998	
1	3 January 1998	20/01/1998	
Name and r	nailing address of the ISA	Authorized officer	
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL ~ 2280 HV Rijswijk		
	Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G	

Inte onal Application No PCT/EP 97/04828

		PCT/EP 97,	01020
C.(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	EP 0 216 278 A (MERCK PATENT GMBH.) 1 April 1987 cited in the application see the whole document		1-5
A	DE 44 27 821 A (SILICA GEL GMBH ADSORPTIONS TECHNIK) 1 February 1996 see the whole document		1-5
,			
ı			
i		į	
	-		
		-	

nformation on patent family members

Int. ional Application No PCT/EP 97/04828

Patent document cited in search report	Publication date	Patent lamily member(s)	Publication date
DE 4307262 A	08-09-94	NONE	
GB 2125018 A	29-02-84	NONE	
US 4124735 A	07-11-78	NONE	
DE 4233396 A	07-04-94	CA 2125176 A DE 59304840 D WO 9407948 A WO 9407945 A EP 0663933 A EP 0615531 A JP 7502301 T JP 8501818 T US 5494949 A US 5698309 A	14-04-94 30-01-97 14-04-94 14-04-94 26-07-95 21-09-94 09-03-95 27-02-96 27-02-96 16-12-97
EP 216278 A	01-04-87	DE 3534143 A DE 3616133 A AU 588363 B AU 6246986 A CA 1280399 A CN 1008081 B DE 3684071 A JP 8025739 B JP 62072514 A US 4911903 A US 4775520 A	02-04-87 19-11-87 14-09-89 26-03-87 19-02-91 23-05-90 09-04-92 13-03-96 03-04-87 27-03-90 04-10-88
DE 4427821 A	01-02-96	DE 4309333 A W0 9603653 A EP 0772776 A AT 156706 T DE 4407338 A W0 9421240 A DE 59403734 D EP 0689430 A JP 8508721 T	22-09-94 08-02-96 14-05-97 15-08-97 07-09-95 29-09-94 18-09-97 03-01-96 17-09-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte Onales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04828

A. KLASSI IPK 6	Fizierung des anmeldungsgegenstandes H01F1/11 803C1/01 C1201/68	G01N33/82 G01N	33/68
Alask 4	Control of the State of the Control	ralikation und dortDV	
	ternationalen Palentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas RCHIERTE GEBIETE	SUMMER OF STATE OF ST	
	ter Mindestprutstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo	le)	
IPK 6	HO1F BO3C GO1N	·	
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprufstoffgehörende Veröffentlichungen, so	wek diese unter die recherchierlen Gebiete	fallen
Wahrend de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Dalenbank (N	ame der Datenbank und evil ver wendel ie S	suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr, Anspruch Nr.
A	DE 43 07 262 A (C. BERGEMANN.) 8. 1994 siehe das ganze Dokument	September	15
_		1004	, ,
A	GB 2 125 018 A (UOP INC.) 29.Febr siehe das ganze Dokument	uar 1984	· 1~5
A	US 4 124 735 A (M. P. O'HORO.) 7. 1978 siehe das ganze Dokument	November	1~5
A	DE 42 33 396 A (MERCK PATENT GMBH 7.April 1994	1. }	1–5
	in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1	
	-	-/	
		70	
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	1
' Besonder		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlich	l worden ist und mit der
abern	icht als besonders bedeutsam anzusehen ist	Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu Erfindung zugrundeliegenden Prinzips	
Anmel	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedei kann allein aufgrund dieser Veröffentli	
schein ander	ien zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden.	erfinderischer Tätigkeit beruhend betra "Y" Veröffentlichung von besonderer Beder	ichtet werden utung; die beanspruchte Erlindung
ausge	führt)	kann nicht als auf erfindenscher Tätigli werden, wenn die Veröffentlichung mit	eit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen
eine B "P" Veröffe	ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, ienutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht ntlichung, die vor dem intermationalen Anmeldedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselber	naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
1	3.Januar 1998	20/01/1998	
Name und I	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inic onales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04828

	PCI/E	PCT/EP 97/04828	
C.(Fortset	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Tede	Beir. Anspruch Nr	
A	EP 0 216 278 A (MERCK PATENT GMBH.) 1.April 1987 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-5	
A	DE 44 27 821 A (SILICA GEL GMBH ADSORPTIONS TECHNIK) 1.Februar 1996 siehe das ganze Dokument	1-5	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich: 1. die zur selben Patentfamilie gehören

Inte inales Aktenzeichen PCT/EP 97/04828

Im Recherchenbericht ngefuhrtes Palentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitgliedler) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4307262 A	08-09-94	KEINE	
GB 2125018 A	29-02-84	KEINE	
US 4124735 A	07-11-78	KEINE	
DE 4233396 A	07-04-94	CA 2125176 A DE 59304840 D WO 9407948 A WO 9407945 A EP 0663933 A EP 0615531 A JP 7502301 T JP 8501818 T US 5494949 A	14-04-94 30-01-97 14-04-94 14-04-94 26-07-95 21-09-94 09-03-95 27-02-96 27-02-96
EP 216278 A	01-04-87	US 5698309 A DE 3534143 A DE 3616133 A AU 588363 B AU 6246986 A CA 1280399 A CN 1008081 B DE 3684071 A JP 8025739 B JP 62072514 A US 4911903 A US 4775520 A	16-12-97 02-04-87 19-11-87 14-09-89 26-03-87 19-02-91 23-05-90 09-04-92 13-03-96 03-04-87 27-03-90 04-10-88
DE 4427821 A	01-02-96	DE 4309333 A WO 9603653 A EP 0772776 A AT 156706 T DE 4407338 A WO 9421240 A DE 59403734 D EP 0689430 A JP 8508721 T	22-09-94 08-02-96 14-05-97 15-08-97 07-09-95 29-09-94 18-09-97 03-01-96 17-09-96

International Publication No. WO 98/12717 A1

SPHERICAL MAGNETIC PARTICLES

Ralf Anselmann and Martin Geoffrey Pellatt

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE WASHINGTON, D.C. MAY 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

INTERNATIONAL PATENT OFFICE WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on

the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 98/12717 A1

International Patent Classification⁶:

H 01 F 1/11

B 03 C 1/01

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/82

33/68

International Filing No.:

PCT/EP97/04828

International Filing Date:

September 5, 1997

International Publication Date:

March 26, 1998

Priority

Date:

September 20, 1996

Country:

DE

No.:

196 38 591.1

SPHERICAL MAGNETIC PARTICLES

[Kugelförmige Magnetische Partikel]

Applicants and/or Inventors (only for US):

Ralf Anselmann

Martin Geoffrey Pellatt

Applicant (for all Designated States with

exception of the US):

Merck Patent GmbH

Designated States:

AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO

Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published

- with International Search Report.
- publication will be repeated if changes to claims are submitted before the end of the allotted period.

The invention concerns spherical magnetic particles based on monodisperse ${\rm SiO_2}$ particles, their preparation and their use.

The use of magnetic particles for immobilization and separation of biological materials is becoming increasingly important. In general, these particles consist of a magnetic core and a protective layer of a metal oxide, on which a polymer layer enables reverse bonding of the biological material to the magnetic particles.

US 4 343 901 describes magnetic particles for immobilization of enzymes, which consist of an inorganic oxide and ferromagnetic particles that are obtained by a sol-gel technique. The surface of the calcined particles is impregnated with a cross linked polyamine and glutaraldehyde.

US 4 152 210 describes a biochemical active substance that consists of ferromagnetic particles and an enzyme that adheres to the particles. The particles consist either of iron coated with nickel or of precipitated iron oxide. In both cases they are coated with aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde. The particles are used for separation of biologically active material from fermentation solutions.

US 4 280 918 describes a dispersion of magnetic particles that is produced by mixing a dispersion of Fe₂O₃ or cobalt-doped Fe₃O₄ that has a positive charge with colloidal SiO₂ that has a negative charge and then treating the dispersion with ultrasound.

EP 0 343 934 describes magnetic particles that consist of a core of a magnetic material and a jacket of an inorganic oxide. They are produced by emulsifying a solution of a salt or an aqueous sol of the magnetic material and a solution of a salt or aqueous sol of the inorganic oxide in a liquid that is not miscible with water, so that discrete droplets are formed. By

* [Numbers in the right margin indicate pagination of the original foreign text.]

/1*

introducing ammonia the droplets are converted to a gel, then separated from the liquid phase, dried and calcined. The resulting particles mainly have a spherical shape.

The magnetic particles known from the prior art have the disadvantage that they do not have uniform size, the formation of agglomerates cannot be prevented, and the weight ratio between the magnetic core and the jacket layer is subject to variation. Because of this the particles do not show uniform behavior in a magnetic field, which has an adverse effect on the separation process.

The task of the invention is to make available monodisperse magnetic particles with a largely uniform size and adjustable ratio between the magnetic material and the other components.

This task is solved in accordance with the invention by monodisperse magnetic particles having a particles size from 50 to 1500 nm, with a spherical shape of silicon dioxide, which is pointwise coated with magnetic particles having a maximum particle size of 60 nm and which has a cover layer of silicon dioxide. In a particular embodiment the magnetic particles are silanized in a known way.

Furthermore, this task is solved in accordance with the invention by a method for producing the magnetic particles, where is a first step silica gel monospheres are dispersed in completely demineralized water at 20°C and pointwise coated with Fe₃O₄ through the addition of a solution of iron(II) sulfate and iron(III) sulfate at a dispensing rate of 0.05 to 3 mg Fe₃O₄ per minute per m² of surface of the monospheres and a pH of 8 is maintained through the simultaneous addition of a base, and in a second step an aqueous acetate solution of tetraethylorthosilane is added to the suspension of the coated monospheres at a rate of 0.1 to 5 mg SiO₂ per minute per m² of surface of the uncoated monospheres, then over a period of 30 minutes the suspension is adjusted to a pH of 9 through the addition of a base and is then heated to 75°C, and after that the resulting magnetic particles (monosphere magnetic beads) are separated, washed with water, and dried at 60 to 100°C, optionally in a vacuum.

Optionally, the resulting monosphere magnetic beads can be silanized by known methods in a third step.

The object of the invention is also the use of the magnetic particles in accordance with the invention for the isolation of nucleic acids and biotin as well as biotinylated proteins from aqueous solutions.

The spherical monodisperse SiO₂ particles that are to be used as starting material are substantially known from the prior art.

The underlying reaction conditions for the production of SiO₂ particles by hydrolytic polycondensation can be learned, for example, from the publications by W. Stober, et al. in J. Colloid and Interface Science 26, 62 (1968) and 30, 568 (1969) and from US Patent 3,634,588.

The articles produced in this way, however, often have large standard deviations for the particle diameter and they have a certain porosity.

For the production of highly monodisperse, nonporous, spherical SiO₂ particles that have a standard deviation of no more than 5%, reference is made to EP 0 216 278, which discloses an appropriately geared production process based on hydrolytic polycondensation. The core of this process, which is preferred for production of SiO₂ particles in accordance with this invention, is a two step procedure. First a sol or suspension of primary particles is formed through hydrolytic polycondensation of tetraalkoxysilanes in an aqueous alkaline-ammonium medium and these primary particles are then brought to the desired end size through the dispensed addition of additional tetraalkoxysilane. The method for producing highly monodisperse, nonporous spherical SiO₂ particles takes place in two steps.

In a first step, a sol of primary particles is produced. For this the tetraalkoxysilane is put into an aqueous alcohol-ammonia hydrolysis mixture and thoroughly mixed. All silicic acid orthoesters of aliphatic alcohols that can be hydrolyzed without problem can be used as suitable tetraalkoxysilanes. Possibilities first of all here are the esters of aliphatic alcohols with 1-5 C atoms such as methanol, ethanol, n-propanol or isopropanol and the butanol and pentanol isomers. These can be used individually or in mixtures. The silicic acid orthoesters of C₁-C₃ alcohols, especially tetraethoxysilane, are preferred. The hydrolysis mixture should contain, besides aliphatic alcohols, from about 0.5 up to about 8 mol/L ammonia and from about 1 up to about 15 mol/L water. Aliphatic C₁-C₃ alcohols like methanol, ethanol or n-propanol or isopropanol are suitable as alcohol component. These can be present in the hydrolysis mixture individually and also in a mixture. The addition of the tetraalkoxysilane to the hydrolysis mixture takes place preferably in one portion, where the reactant can be present in pure form or in a solution in one of the said alcohols. A concentration of tetraalkoxysilane in the hydrolysis mixture between about 0.01 and about 1 mol/L can be chosen to produce the primary particles. After the reactants have been brought together the reaction begins immediately or after a few minutes, which can be seen from an immediate opalescence or cloudiness of the reaction mixture caused by the resulting particles. The reaction is complete in general in more than 15-30 minutes, possibly longer is particular unfavorable instances. Particles with average diameter between about 0.01 and about 2 μ m can be obtained in each case according to the choice of the reactants and their concentrations in the reaction mixture, in correspondence with known methods.

Reaction mixtures that contain 3-13 mol/L water, 0.5 to 4.5 mol/L ammonia, 10 to 25 mol/L alcohol and 0.1 to 0.5 mol/L tetraalkoxysilane are preferred in this first step of the method in accordance with the invention. Here one obtains primary particles with average diameters between 0.01 and 1 μ m. In this step samples can be taken from the sol of primary

/4

particles in order to investigate the particles for particle size, trueness to form and particle size distribution, for example using an electron microscope.

Through isolation of particle samples there is the possibility of determining the porosity of the primary particles, for example by gas adsorption measurement.

It proves to be advantageous to conduct the reaction for producing the primary particles at higher temperature. Here temperatures between 35 and 75°C, preferably between 40 and 65°C, are preferred. It turned out that at higher temperature the particle size scattering decreases, but the average particle size also decreases. At lower temperature, i.e. around room temperature, one obtains larger particles with higher size scattering, if all other conditions are the same. In addition, increasingly undesired agglomerate formation will also be seen here.

The second step of the method involves slow continuous dispensing of additional tetraalkoxysilane to the sol of primary particles, while maintaining uniform mixing. Here it is important that the rate of dispensing be controlled so that an immediate complete reaction with particles in the sol takes place without an excess of tetraalkoxysilane developing, which could form seeds for new primary particles. Under these measures of dispensing the tetraalkoxysilane in measure with the reaction one achieves a controlled secondary growth of the particles in the sol, with the particle size that is ultimately to be achieved being governed by the total amount of tetraalkoxysilane. The amount of the added alkoxysilane is in principle not critical, as long as the hydrolysis mixture is present in an excess quantity, or is kept in excess through possible addition of the hydrolysis mixture. No time limit is set for the addition of the tetraalkoxysilane; the addition can extend from hours to days. Also, interruptions and restarting the secondary growth are possible, since the particles are stable in all stages of their growth. In the secondary growth process as well it is preferable to operate at higher temperatures, for instance around 40°C.

Monodisperse spherical silica particles with a particle size of 50 to 1500 nm can be produced by this method, and a desired size can be established very precisely, since the standard deviation of the average particle diameter is only 2 to 5%.

The pointwise coating of the silica monospheres with magnetite takes place by precipitation from a solution of iron(II) and iron(III) salts, preferably from a solution of iron(II) and iron(III) sulfate. The mol ratio between the divalent and trivalent iron salt is 1:1. It should be noted that the precipitation solutions must be protected against oxidation. The presence of oxidizing or reducing agents is not necessary during the precipitation.

The pH value of the monosphere dispersion is preferably adjusted to values between 7 and 9, preferably 7.5 to 8.5, for the precipitation of the magnetic Fe_3O_4 (magnetite). The pH is kept constant during the precipitation reaction through the addition of a base, preferably a 25% aqueous ammonia solution. The temperature of the suspension is set to 0 to 40°C.

The dispensing rate of the iron(II)-iron(III) salt solution is between 0.05 and 3 mg Fe_3O_4 per minute per m² surface, preferably between 0.2 and 1 mg Fe_3O_4 per minute per m² of surface of the monosphere.

Under the indicated conditions a pointwise deposition of the magnetite onto the surface of the monospheres takes place. The size of the magnetite particles is a maximum of 60 nm.

The addition coating of the magnetic particles with SiO₂ takes place by hydrolysis of tetraalkylorthosilanes, preferable tetraethylorthosilane. For this the suspension of monospheres coated with magnetite is adjusted to a temperature of 0 to 40°C, preferably 10 to 30°C, and an aqueous acetate solution of tetraethylorthosilane is dispensed at a pH of 7 to 9, preferably 7.5 to 8.5. The concentration of the silane in the solution is 10 to 50, preferably 20 to 40 SiO₂/L. The dispensing rate is adjusted to 0.1 to 5 mg SiO₂ per minute per m² of surface of the uncoated monospheres, preferably 1 to 2 g SiO₂ per minute per m² of surface. After the dispensing is over, the suspension is heated to 60 to 90°C, preferably 70 to 80°C, and the pH is raised to 8-10 with a 25% ammonia solution in a period of 30 minutes and the suspension is held at this temperature and pH for 30 minutes. After being cooled to room temperature, the SiO₂-coated magnetic particles are separated and washed with demineralized water until free of salts. Then they are redispersed in demineralized water.

In one particular embodiment the surface of the magnetic particles can be modified by covalently bonded organic groups. The silanes that are used for this are designed so that they have functional groups with which reversible bonding of the material to be separated to the magnetic particles can be achieved. Suitable silanizing agents are compounds of formula I

$$[R^1R^2R^3]Si-(CH_2)_{1-X-R^4}$$
 (I)

in which

R¹ means Cl or alkoxy with 1-6 C atoms

 R^2 , R^3 mean alkyl with 1-6 C atoms or have the meaning of R^1

1 means the numbers 1-6

X is a single bond, O, NH, CONH, NHCONH

R⁴ is

with

/7

$$Y = CH \text{ or } -$$

Z = OR or two residues Z together mean -O- or and m and n mean numbers 0-6,

CR'R" || |-C-COOR

X is a single bond, with R, R', R'' = H or alkyl with 1-6 C atoms.

The covering layer of SiO₂ that is on the magnetic particles has free or hydrated element-O- or element-OH- space groups on the surface, which are available to a chemical reaction with the silanizing agent with the formation of covalent of silicone-oxygen-silicone compounds. The magnetic particles are reacted with the silanizing agent in an aqueous alcohol suspension, where the ratio of water to ethanol is 2.5:1.5. Details of the silanizing process can be learned from DE 42 33 396 and DE 43 16 814, from which silanizing agents mentioned above are also known.

The magnetic particles in accordance with the invention can be used for the isolation of nucleic acids from aqueous solutions and for the isolation and purification no biotin and biotinylated proteins from aqueous solutions.

Since nucleic acids are bonded directly to the silicone dioxide, a secondary treatment of the magnetic particles, for example with silanes, is not necessary.

For the extraction of DNA from agarose gel a piece of the gel that has been treated with ethidium bromide is transferred to a suitable vessel and a silica-binding buffer with a pH of 8.0 is added. The gel is resuspended and mixed with magnetic particles. After heating the suspension to 50°C for 10 minutes, the particles are drawn to the wall of the vessel by means of a magnetic and the remaining liquid is removed. After redispersing and washing the magnetic particles with the above buffer solution once the washing is repeated with a buffer containing ethanol and having a pH of 7.2. Then the magnetic particles are dried, resuspended in a tris-HCl buffer with pH of 8.0 and eluted after being heated to 50°C for 5 minutes. The magnetic particles are separated from the buffer solution, which contains the DNA, in a magnetic field.

The buffer solutions that are needed for the separation of DNA from aqueous solutions by means of magnetic particles are sold by Merck KGaA. As the most important components they contain NaClO₄, tris-HCl and EDTA. This separation process is described in more detail by the following authors: Vogelstein, B.; Gilespie, D. (1979), Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619; Yang, R. C. A.;

/9

Lis, J.; Wu, B. (1979), Elution of DNA from Agarose Gels After Electrophoresis; Methods Enzymol, 68, 176-182; Boom, R.; Sol, C. J. A.; Salimans, M. M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim-van Dillen, P. M. E., van der Noordaa, J. (1990), Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.

For the isolation and purification of biotin and biotinylated proteins or nucleic acids from aqueous solutions using magnetic particles to which streptavidin is coupled it is necessary to modify the surface of the magnetic particles with organic groups. The silanes noted above, for example γ -aminopropylsilane, are suitable for this. The coupling of streptavidin is improved even more if a modification with azlactone takes place after the silanizing of the SiO₂ surface. This method for recovery of biotin and biotinylated proteins or nucleic acids from aqueous solutions is described in more detail by the following authors: Hultman T., Stahl S., Homes E., Uhlén M., Direct Solid Phase Sequencing of Genomic and Plasmid DNA Using Magnetic Beads as Solid Support, Nucleic Acids Research 1989; 17(13):4937-4946; Ahmed ARH, Olivier GWJ, Adams G, Erskine ME, Kinsman RG, Branch SK, Moss SH, Notarianni LJ, Pouton CW, Isolation and Partial Purification of a Melanoctye-Stimulating Hormone Receptor from B16 Murine Melanoma Cells; A Novel Approach Using a Cleavable Biotinylated Photoactivated Ligand and Streptavidin-Coated Magnetic Beads, Biochem J 1992; 286:377-382; Wahlberg J. Hultman T, Uhlén M, Solid Phase Sequencing of PCR Products in: McPherson MJ, ed. PCR II – A Practical Approach Oxford: IRL Press, Oxford University Press, 1994; Danilo A. Tagle, Manju Swaroop, Michael Lovett and Francis S. Collins (1993), Magnetic Bead Capture of Expressed Sequences Encoded Within Large Genomic Segments, Nature 361m 751-753.

Magnetic particles coupled with streptavidin are sold by Merck KGaA under the designation "Bio Beads Streptavidin."

The binding capacity of the magnetic particles in accordance with the invention is about 5 μ g per mg of beads for DNA. For the streptavidin-coated particles the binding capacity is very highly dependent on the substance that is to be isolated.

The spherical magnetic particles in accordance with the invention have the advantage that they are monodisperse, non-porous and can be produced in different sizes. The standard deviation of the average diameter is less than 5%. The weight ratio between the magnetic material and the other components can be adjusted within narrow limits. Because of this the particles exhibit uniform behavior in a magnetic field.

The following examples are intended to illustrate the invention without limiting it.

Example 1

700 g monospheres (with respect to SiO₂ content) with average particle diameter of 500 nm are introduced into 1500 g demineralized water while stirring and the mixture is

/12

dispersed for one hour with an Ultra-Turrax. Then the dispersion is adjusted to an SiO₂ content of 5% with 11800 g demineralized water and temperature is adjusted to 20°C.

210 g iron(II) sulfate heptahydrate (Merck KGaA Article No.: 1.03965) and 380 g iron(III) sulfate hydrate 80% (Merck KGaA Article No.: 8926) are dissolved with stirring in 4500 g demineralized water and transferred to a sealable supply vessel.

Then a 10% aqueous ammonia solution to keep the pH constant is transferred to a sealed supply vessel.

The iron sulfate solution is now dispensed over a period of 2 hours into the monosphere dispersion that is at 20°C, and the pH is adjusted to 7.7 at the same time through the addition of the ammonia solution. After a half hour the secondary reaction of SiO₂ coating begins.

350 g tetraethylorthosilane is dissolved in a mixture of 290 g ethyl acetate and 2275 g demineralized water over 30 minutes while stirring in a sealed apparatus. The resulting solution is dispensed into the dispersion of monospheres coated with magnetite at a rate of 120 mL/min. Then over 30 minutes the pH is raised to 9.0 with the aqueous ammonia solution and the dispersion is heated to 75°C and held for 30 minutes at this temperature. After being cooled to room temperature, the dispersion is processed further.

Over a period of 8 hours the dispersion is washed 5 times with 6 L demineralized water while decanting, where the sedimentation rate of the magnetic particles is accelerated through the application of a magnetic field. The resulting dispersion is adjusted to a weight content of 20%.

Example 2

190 mL ethanol is added to 400 mL of a suspension of magnetic particles obtained as in Example 1 in order to establish a volume ratio of water to ethanol of 2.5:1.5. Then a mixture of 57.5 g γ -aminopropyltriethoxysilane in 57.5 g ethanol is added. The mixture is boiled at reflux for 10 hours, after which the solvent is removed, the particles are washed with ethanol and redispersed in water, and the content of dry substance is adjusted to 20 wt%. The magnetic particles have terminal amino groups bonded to the surface. The further use of the magnetic particles takes place in the form of the aqueous dispersion.

Claims

- /13
- 1. Monodisperse magnetic particles having a particle size of 50 to 1500 nm with a spherical core of silicon dioxide, which is coated pointwise with magnetic particles having a particle size of less than 60 nm and which has thereon a covering layer of silicon dioxide.
- 2. Particles as in Claim 1, which are characterized by the fact that they have been modified with a compound of formula (I)

[R1R2R2]Si-(CH2)1-X-R4

in which

R¹ means Cl or alkoxy with 1-6 C atoms

R², R³ mean alkyl with 1-6 C atoms or have the meaning of R¹

1 means the numbers 1-6

X is a single bond, O, NH, CONH, NHCONH

R⁴ is

with

$$V = CH \text{ or } -$$

Z = OR or two residues Z together mean -O- or and m and n mean the numbers 0-6,

or

CR'R" -C-COOR

X is a single bond,

with R, R', R'' = H or alkyl with 1-6 C atoms.

- 3. A method for producing monodisperse magnetic particles as in Claim 1, which is characterized by the fact that in a first step silica monospheres are dispersed in demineralized water at 20°C and coated pointwise with Fe₃O₄ through the addition of a solution of iron(II) sulfate and iron(III) sulfate at a dispensing rate of 0.05 to 3 mg Fe₃O₄ per minute per m² of monosphere surface, where a pH of 8 is maintained through the addition of a base, and in a second step an aqueous, acetate solution of tetraalkylorthosilane is added to the suspension of the coated monospheres at a rate of 1 to 5 mg SiO₂ per minute per m² of surface of the uncoated monospheres, then the suspension is heated to 75°C and over a period of 30 minutes adjusted to a pH of 9 through the addition of a base, and then the resulting magnetic particles are separated, washed with water, and redispersed in demineralized water.
- 4. A method for producing monodisperse magnetic particles as in Claim 3, which is characterized by the fact that ethanol is added to the dispersion of the magnetic particles in an amount so that a volume ratio of water to ethanol of 2:1.5 is achieved and then a compound of formula (I)

/14

(1)

in which

R¹ means Cl or alkoxy with 1-6 C atoms

R², R³ mean alkyl with 1-6 C atoms or have the meaning of R¹

1 means the numbers 1-6

X is a single bond, O, NH, CONH, NHCONH

R⁴ is

with

$$Y = CH \text{ or } -$$

Z = OR or two residues Z together mean -O- or and m and n mean the numbers 0-6,

or

X is a single bond,

with R, R', R" = H or alkyl with 1-6 C atoms, is added in an ethanolic solution and after boiling at reflux for 5 to 24 hours the modified magnetic particles are separated, washed and redispersed in demineralized water.

5. The use of the magnetic particles as in Claim 1 or 2 for the isolation of nucleic acids and biotin as well as biotinylated proteins from aqueous solutions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT anal Application No PCT/EP 97/04828 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER [PC 6 H01F1/11 B03C1/01 C1201/68 G01N33/82 G01N33/68 According to International Paters Chastel caroni IPC) or to both national classification and IPC B. FIELOS BEARCHED Missmum documentation searched (classification system followed by classification sympolis) IPC 6 HOIF BO3C GOIN Documentation searched other than minimum occurrentation to the extent that such goodments are included in the helds searched Finctions, data base consisted during the interfational south theme of data base and, where practical search terms used C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Ctation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. DE 43 07 262 A (C. BERGEMANN.) 8 September A 1-5 see the whole document GB 2 125 018 A (UOP INC.) 29 February 1984 A 1-5 see the whole document US 4 124 735 A (M. P. O'HORO.) 7 November A 1-5 1978 see the whole document DE 42 33 396 A (NERCK PATENT GMBH.) 7 Á 1~5 April 1994 cited in the application see the whole document -/--Further docurrents are listed in the continuation of box C. Palent tamily members are based in annex. eosi categories of cited documento "I' later document published effer the international filing date of preemy date and not in conflict were the application but could be understand the principle or theory underlying the "A" document defining the gatteral state of the air which is not considered to be of particular selevance." "E" eather document but published on or after the ellernational filing gate "X" document of paracular miliprance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step which the document is taken alone "L" discussest which may filter doubts on priority claim(as or which is cilled to establish the publicationdals of another citation or other spaces reason (as specified) document of particular relevance; the obtained intention in care and obtained of considered to involve an inventive stop when the obtained intention stop when the obtained in combined with one or more other auton documents. Such combination being convoir to a person saided in the art. "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means. "Ocument published prior to the international filling date bitlered than the priority date daimed." "&" document member of the same patent tamely Date of the actual compresson of their immational aparch Date of making of the unemational search report 13 January 1998 20/01/1998 Name and matting eddress of the ISA Authorized officer Buopean Pasent Office. P.B. 5816 Paisentean 2. Alt. – 2206 IV Rijsenti. Yel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 551 epo ni. Fas: (+31–70) 340–3015 Griffith, G

	INTERNATIONAL SEARCH REPORT	Inte and Appreciation No PCT/EP 97/04828
C.(Cominu	even) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Attivant to dom No.
A	EP 0 216 278 A (MERCK PATENT GMBH.) 1 April 1987 cited in the application see the whole document	1-5
4	DE 44 27 821 A (SILICA GEL GM8H ADSORPTIONS TECHNIK) 1 February 1996 see the whole document	1-5
	4	
•	**	
	·	

page 2 of 2

nformation on patent family members

test tenet Application No PCT/EP 97/04828

pe.	took store	•	Publication	Paleni (améy		Publication
	itent documen i er search rep		date	menber(s)		date
DE	4307262	A	08-09-94	NONE		
GB	2125018	A	29-02-84	NONE		
US	4124735	A	07-11-78	NONE		
DE	4233396	A	07-04-94	CA 2125176		14-04-94
				DE 59304840	-	30-01-97
				WO 9407948 WO 9407945		14-04-94 14-04-94
				EP 0663933		26-07-95
				EP 0615531		21-09-94
				JP 7502301		09-03-95
			•	JP 8501818		27-02-96
				US 5494949		27-02-96
				US 5698309		16-12-97
	216278	Α	01-04-87	DE 3534143	λ	02-04-87
25	2102/0	н	V1-V4-07	DE 3616133		19-11-87
				AU 588363		14-09-89
				AU 6246986		26-03-87
				CA 1280399		19-02-91
				CN 1008081		23-05-90
				DE 3684071		09-04-92
				JP 8025739		13-03-96
				JP 62072514		03-04-87
				US 4911903		27-03-90
				US 4775520	A	04-10-88
DE	4427821	A	01-02-96	DE 4309333	A	22-09-94
_		••		WO 9603653		08-02-96
				EP 0772776	A	14-05-97
				AT 156706	T	15-08-97
				DE 4407338	A	07-09-95
				WO 9421240	A	29-09-94
				DE 59403734		18-09-97
				EP 0689430		03-01-96
				JP 8508721	Ţ	17-09-96